

THESIS

MUNICH

1967

Vaccinaler Immuntransfer
mit Zellfraktionen
immun-kompetenter Zellen

Paul Grotemeyer

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF. 94304



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Bayerischen Landesimpfanstalt München

Direktor: Prof. Dr. H. Stickl

V a c c i n a l e r I m m u n t r a n s f e r
m i t Z e l l f r a k t i o n e n
i m m u n - k o m p e t e n t e r Z e l l e n

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Paul Grotemeyer

aus

München

München 1967

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H.Stickl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. D.Vogt

Dekan: Prof. Dr. M.Kiese

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 1967

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einleitung:</u>	1
- Humorale Antikörper und geweblich fixierte Immunreaktionen	
- Gewebeallergie und Gewebeimmunität	
II. <u>Material und Methoden:</u>	3
- Virus	3
- Chorioallantoismembran embryonierter Hühnereier	3
- Gewinnung der Leukozyten	4
- Spendertiere	5
- Versuchsanordnung und -auswertung	5
-- Grundversuch	6
-- Modifikationen des Grundversuches	9
- Aufarbeitung der Leukozyten	13
1. Erhitzen auf 56° C	13
2. Erhitzen auf 80° C	13
3. Frieren und Auftauen	13
4. Trypsinbehandlung	14
5. Ribonucleasebehandlung	14
6. Extraktion der Nukleoproteide	14
7. Extraktion der Zellkerne mit Tween 80	15
8. Extraktion der Zellkerne mit Saponinlösung	16
9. Quinacrinebehandlung	16
10. Behandlung mit Neuraminidase ("RDE") und Pyrexal ^R bzw. Piromen ^R	17
III. <u>Beschreibung der Versuche:</u>	
A. Infektion der Chorioallantoismembran mit Vaccine-Virus und Beeinflussung des Infektionsverlaufes durch Leukozyten	18
1. Leukozyten - ernutzt auf 56° C	18
2. Leukozyten - erhitzt auf 80° C	21

3. Leukozyten - gefroren und aufgetaut	
a) Sediment	22
b) Überstand	23
4. Leukozyten - mit Trypsin behandelt	24
5. Leukozyten - mit RNase behandelt	25
6. Nukleoproteide - aus Leukozyten extrahiert	27
7. Zellkerne - aus Leukozyten extrahiert	29
8. Leukozyten - a) mit RNase und Quinacrine behandelt	30
- b) mit Quinacrine be- handelt	32
9. Leukozyten - a) mit Neuraminidase behandelt	33
- b) mit Pyrexal ^R bzw. Piromen ^R behandelt	35
B. Verteilung der Leukozyten auf der Eihaut	36
C. Zusammenfassung der Ergebnisse (Tabelle)	38

IV. Diskussion:

- Humorale Immunität	39
- Zellständige Immunität	39
- Wechselbeziehungen von humoraler und gewe- blicher Immunität	39
- Besonderheiten beider Systeme	40
- Gewebeallergie und Gewebeimmunität	42
- Besprechung der Ergebnisse	44
- Mögliche Auswertung für klinisch praktische Zwecke	48
-- Wertbemessung von Pockenschutzimpfstoffen	48
-- Austestung gewebeimmunogener Eigenschaften anderer Impfstoffe	49

-- Erkenntnis für die theoretische Immuni- tätsforschung	50
---	----

V. Zusammenfassung:

Literaturverzeichnis	52
----------------------	----

Lebenslauf	53
------------	----

I. Einleitung:

Die Entwicklung der Immunitätslehre führte in den letzten zehn Jahren zu einer immer größeren Ausdifferenzierung ihrer Begriffe: neben den in ihrer Biologie und chemischen Natur untersuchten humoralen Antikörpern, fanden die geweblich fixierten Immunreaktionen größte Aufmerksamkeit. Bei der humoralen und geweblichen Immunität handelt es sich um getrennte Grundsysteme (GÜNTHER; Lit. s.b. STICKL und ENGELHARDT). Die spezifische Reaktion vom Spättyp (Tuberkulin-Typ-Reaktion - delayed hypersensitivity - Gewebeallergie) ließ sich auf die Reaktion bestimmter Zellen mit einem Antigen zurückführen.

Diese geweblichen Immunreaktionen lassen sich ihrerseits wieder unterscheiden in eine "Gewebeallergie" und in eine "Gewebeimmunität". Der "Gewebeallergie" sind die "Reaktionen vom Spättyp" im engeren Sinne zuzuordnen (Lit. s.b. ARNASON und WAKSMAN; F. SCHMID; STICKL und ENGELHARDT; u.a.). Unter "Gewebeimmunität" - dem Thema der vorliegenden Untersuchung - verstehen wir die Hemmung einer schrankenlosen Vermehrung von pathogenen Erregern durch Zellen und Gewebe ohne das nachweisbare Vorhandensein von humoralen Antikörpern (Lit. HOLLAND und PICKETT; STICKL, 1965). Bei der "Gewebeallergie und -immunität" kommt es nach bisherigen Untersuchungen in erster Linie zu einer Reaktion von Lymphozyten, der lymphatischen Organe und des Reticulo-histiocytären Systems mit bestimmten Antigenen; diese vermögen die "kompetenten" Zellen zu mobilisieren; letztere vermitteln ihrerseits

die Spätreaktion und die zellgebundene Gewebeimmunität.

Solche "Immunzellen" können an den Antigenherd gelangen, dort eine Antigen-Antikörper-Reaktion eingehen, wobei ein Teil dieser Zellen zerstört wird (Immuncytolyse). Die hierbei frei werdenden Reaktionsprodukte erzeugen ihrerseits weitere Reizantworten des Gewebes, wie die proliferative Entzündung und (als überschießende oder gemischte Reaktion) die exsudative Entzündung (s.b. LETTERER).

Nach LETTERER (Lit. s.d.) stellt die Allergie lediglich eine Vorstufe der Immunität dar; bei Allergie und Immunität handele es sich - wenigstens innerhalb des humoralen Immunsystems - um prinzipiell identische Vorgänge. Die spärlichen Versuche, inwieweit dies auch für die geweblich fixierte Art der Immunität und Allergie zutrifft, lassen diese Annahme jedoch nicht zu. So gelang z.B. ein zellulärer Transfer ausschließlich der Gewebeimmunität auf HELA-Zellkulturen (STICKL). Andererseits führt die Cytolysereaktion, als zellulärer Ausdruck einer intensiven gewebeallergischen Antwort auf den Antigenreiz, allein nicht zu einer Vernichtung der eingedrungenen Erreger (s.b. F. SCHMID; TRAUZETTEL, u.a.). Somit handelt es sich bei der "Gewebeallergie" und "Gewebeimmunität" offensichtlich nicht um identische Vorgänge oder um verschiedene Stufen eines prinzipiell gleichen Funktionssystems.

Andere Zellen des histio-reticulären Systems, offensichtlich Plasmazellen, scheinen für die Antikörperbildung verantwortlich zu sein (zusf. Darst. s.b. H.E. SCHULTZE).

Es liegt nahe, die für die "Gewebeallergie und -immunität" immunologisch spezifischen Zellen zu isolieren und in vitro zu untersuchen, wie sie sich hinsichtlich der Funktion einzelner Zellbestandteile bzw. -organellen und hinsichtlich ihrer Spezifität verhalten.

Die vorliegende experimentelle Untersuchung versucht diese letztere Frage durch die Übertragung von weißen Blutzellen Vaccine-immuner Versuchstiere auf einen heterologen Empfänger zu klären. Außerdem wird in den folgenden Versuchen der Frage nachgegangen, welche Zellbestandteile oder -organellen noch über die Antikörpereigenschaften verfügen, die sich im Sinne eines sog. "zellulären Transfers" passiv übertragen lassen.

II. Material und Methoden:

V i r u s : Zur Infektion der gesenkten Eihäute wurde ein auf Gewebekulturen gezüchtetes Vaccine-Virus (Stamm: Bern-München der Bayerischen Landesimpfanstalt) verwendet; das Virusgehalt des Gewebekulturmediums (TCM 199) betrug $10^5 - 10^6$ PFU/ml (plaques forming units). Es wurde für die Versuche auf 1:100 bzw. 1:500 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Infektion erfolgte durchschnittlich mit einer Virusmenge von $0,8 \times 10^2$ PFU pro gesenkte Eihaut.

Infektion der A l l a n t o i s m e m b r a n e n :

Das Vaccine-Virus wurde in 19 Versuchsgruppen (insgesamt 891 Eier) auf die gesenkten Eihäute von embryonierten Hühnereiern in folgender Weise aufgeimpft: 11 Tage alte embryonierte Eier wurden durchleuchtet, die Luftblase angezeichnet.

Die Kalkschale wurde an zwei Stellen in einer Größe von ca. 5 mm² eröffnet; 1. über der Luftblase und 2. über der gefäßreichsten Stelle, die beim Durchleuchten mit einer Glühbirne (25 W) im abgedunkelten Raum zu erkennen war. Nach Aufbringen eines Tropfens physiologischer Kochsalzlösung bei der 2. Stelle wurde die Schalenhaut an beiden Öffnungen durchtrennt. Bei der nochmaligen Zugabe von 2 Tropfen physiologischer Kochsalzlösung auf die gleiche Stelle senkte sich der Hühnerembryo einschließlich der ihn umgebenden Eihaut unter Verdrängung der Luftblase. Erfolgte diese Senkung nicht spontan, so wurde durch vorsichtiges Ansaugen (Einreißen der Gefäße!) in der Luftblase ein geringer Unterdruck erzeugt. Mit dieser Methode ließ sich die Eihaut immer von der Schalenhaut trennen. Nach Einbringen des Vaccine-Virus in die neu gebildete Kammer und nach Zugabe der Leukozyten bzw. ihrer Fraktionen (s. unten) wurde die Kalkschale mit erwärmtem Paraffin wieder verschlossen.

Nach Inkubation über 48 Std. bei 37° C wurde die Schale durchtrennt, die Eihaut von der Schalenhaut abgezogen und in Aqua dest. ausgewaschen. Das Auszählen der Virusplaques erfolgte mit unbewaffnetem Auge bzw. einer Lupe in einer Petrischale auf dunklem Untergrund.

Eventuelle Abweichungen von der geschilderten Versuchsanordnung sind bei den einzelnen Versuchen beschrieben.

Gewinnung der L e u k o z y t e n : Das Blut wurde aus der Ohrarterie bzw. der Ohrvene Vaccine-immuner Kaninchen entnommen. Um es ungerinnbar zu halten, wurden zu 10 ml Blut je 4000 E Heparin (Liquemin Roche) zugesetzt. Nach

gutem Durchmischen wurde es 45 min bei 4° C in den Kühlschrank gestellt und anschließend ohne weiteres Aufschütteln 5 min bei 350 U/min zentrifugiert. Der Plasmaüberstand enthielt die Leukozyten. Nach Abpipettieren wurde der Plasma-Leukozytensuspension die gleiche Menge physiologischer Kochsalzlösung zugegeben. Durch Sedimentation (10 min bei 2600 U/min) wurden die Leukozyten isoliert und nochmals in physiologischer Kochsalzlösung (Resuspension, Sedimentation) ausgewaschen. Die Zugabe der Leukozyten bzw. der Leukozytenfraktionen erfolgte 1/2 Stunde nach der Infektion der Eihaut mit dem Vaccine-Virus in einer Anzahl von 2,4 - 13 Millionen Zellen bzw. einer Fraktion aus diesen (Einzelheiten s.b. Beschreibung der Versuche). Die große Abweichung ergab sich aus Fehlern beim Zentrifugieren, Abpipettieren und dem wechselnden Gehalt des Kaninchenblutes an Leukozyten.

Immunisierung und Impfung der Spendertiere: Bei den Tieren handelte es sich um massiv nach HERZBERG flächenhaft skarifizierte und mit Vaccine-Virus beimpfte deutsche Albino-Riesenkaninchen. Die Blutentnahme erfolgte 3 - 8 Wochen p.v., also auf dem Höhepunkt der Vaccineimmunität der Kaninchen. Zur Kontrolle wurden die Leukozyten aus dem Blut von nicht immunen, unvorbehandelten Tieren der gleichen Rasse und auf gleiche Weise gewonnen.

V e r s u c h s a n o r d n u n g u n d - a u s w e r t u n g :
Die Plaques-hemmende Wirksamkeit von Kaninchenleukozyten und ihrer Fraktionen (s.u.) wurde auf der infizierten Chorio-Allantoismembran embryonierter Hühnereier ausge-

testet. Allen Versuchen wurde der folgende Grundversuch vorangestellt. Er diente auch als sog. "positive" Kontrolle der Frage, ob die in den weiteren Versuchen verwendeten Leukozytenfraktionen von immunologisch wirksamen Blutzellen stammten. Eine Aussage über die Wirksamkeit dieser Fraktionen ist naturgemäß nur möglich, wenn die Plaques-hemmende Aktivität der Ausgangsfraktion bekannt ist. Neben der Leerkontrolle begleitete er alle Versuche als sog. "positive" Kontrolle. Jeder Versuch war von den nachstehenden Kontrollen begleitet:

- a) ausschließliche Virusinfektion (Leerkontrolle);
- b) Virusinfektion und Zugabe von Leukozyten
immuner Kaninchen (positive Kontrolle);
- c) Virusinfektion und Zugabe von Leukozyten
nicht immuner Kaninchen (wurde nur bei einigen
Versuchen durchgeführt; s. dort).

In der Regel zeigten sich bei der "positiven" Kontrolle b nach 48 Std. ca. 50% weniger Plaques als bei der Leerkontrolle a und c. Ein wesentlicher Unterschied zwischen a und c ergab sich nicht, so daß bei einigen Versuchen auf Kontrolle c verzichtet werden konnte (s. Kap. III.: Versuche).

Nach 72 Std. hatte sich das Vaccine-Virus bei a so stark vermehrt, daß ein genaues Auszählen der Plaques nicht mehr möglich war. Sie konfluieren, wiesen nicht mehr den porzellanartigen Glanz auf, und in ihren Zentren fanden sich Nekrosen. Bei der "positiven" Kontrolle b zeigte sich ebenfalls ein stärkeres Viruswachstum, jedoch auch jetzt noch gegenüber der Leer-

kontrolle deutlich gehemmt. Die Farbe der Virusplaques war ausgeprägter, und zentrale Nekrosen waren wesentlich seltener zu sehen (s.a. Abb. 1 u. 2). So wurde in allen weiteren Versuchen die Versuchsdauer auf 48 Std. beschränkt.

Da sich bei diesem Grundversuch, wie auch bei allen folgenden Versuchen, innerhalb der gleichen Reihe sehr starkes wie auch sehr schwaches Plaqueswachstum fand, wurden für die Auswertung nur diejenigen Plaqueszahlen verwendet, die innerhalb des doppelten mittleren Fehlers ($\epsilon = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{N(N-1)}}$) lagen.

In Tabelle 1 sind diese Werte für den Grundversuch in vergleichender Weise eingetragen.

Tabelle 1.

Virus (Leerkontrolle a)		Virus u. Leukozyten (positive Kontr. b)	
	$2\epsilon = \pm 32.4$		$2\epsilon = \pm 5.8$
9		19	
60	60	23	
80	80	24	24
85	85	30	30
88	88	33	33
130		37	
X		39	
X		X	
75.3	78.3	29.3	29
Arithmetisches Mittel			

X während des Versuches abgestorben.

Betrachtet man den Grundversuch und die Kontrollen aller folgenden Versuche geschlossen, so ergibt sich folgendes Bild:

Tabelle 2.

Ausgangsmaterial (infizierte Eihäute)	Beimpfung mit Vaccine-Virus (Leerkontrolle a)	Beimpfung mit Vaccine-Virus u. Leukozyten (pos. Kontr. b)
Gesamtzahl der ver= wendeten Hühner = embryonen	127	121
Hiervon innerhalb 48 Std durch Präpa= ration abgestorben	35	35
Durch den doppelten mittleren Fehler ausgeschieden	39	32
Zu verwertende Eihäute	53	54

Bei der Leerkontrolle ergab dies im Durchschnitt 73 Plaques und einen mittleren relativen Fehler $(\Delta = \frac{\varepsilon}{x} \cdot 100 [\%])$ von $\pm 13\%$; bei der positiven Kontrolle b 28 Plaques und einen mittleren relativen Fehler von $\pm 20\%$.

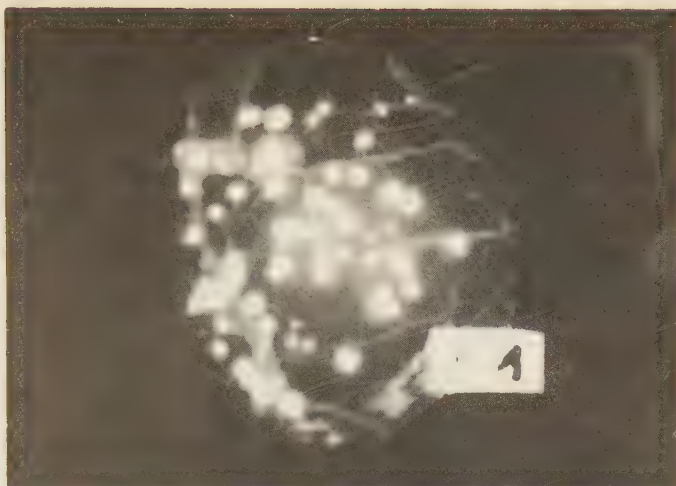


Abb. 1 Eihaut mit Vaccine-Virus-Plaques (ohne Zugabe von Leukozyten bzw. einer Leukozytenfraktion).

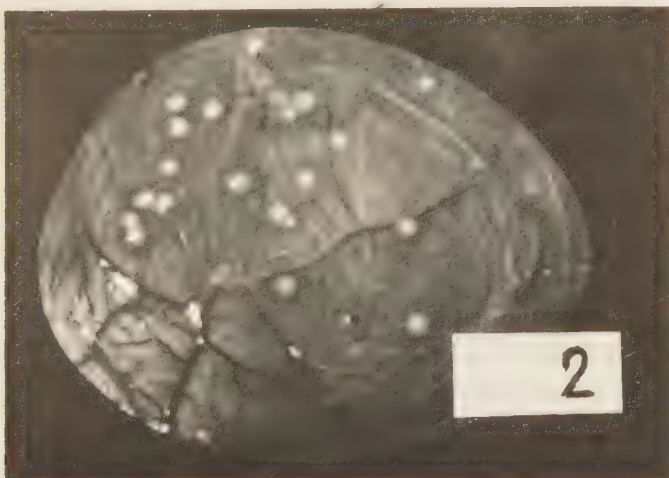


Abb. 2 Eihaut mit Vaccine-Virus-Plaques - Zugabe von Leukozyten eines Vaccine-immunisierten Kaninchens - Hemmung des Virus-Wachstums.

In weiteren Kontrollversuchen wurde der genannte "Grundversuch" wie folgt modifiziert:

aa) Zugabe der Leukozyten 30 min vor der Infektion mit dem Vaccine-Virus;

- bb) Mischen der Leukozyten und des Virus in vitro,
20 min Inkubation mit dem Virus (Immuncytolyse-
reaktion), anschließend Zugabe auf die Chorio-
Allantois der bebrüteten Hühnereier;
- cc) Wiederholung des Versuches bb, jedoch Inkubation des
Virus mit den Leukozyten nur 3 min bei Raumtemperatur;
(bei cc keine Cytolysereaktion der "sensibilisierten"
Zellen durch das korrespondierende Antigen).

Beim Versuch aa ist der Unterschied zwischen der
"positiven" Kontrolle des Grundversuches (b) und der be-
schriebenen Modifikation (aa), bei der die Leukozyten
vorausgegeben wurden und die Infektion später erfolgte,
so gering, daß er sich innerhalb der Fehlerbreite be-
findet. Dieser Versuch (aa) brachte daher keinen Gewinn
gegenüber dem anfangs beschriebenen Vorgehen beim
Grundversuch (s. Tab. 3, Abb. 3).

Tabelle 3.

Ansatz	Leerkontr. a		pos.Kontr. b		Fraktion, aa	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	133	100	48	36.1	35	26.3

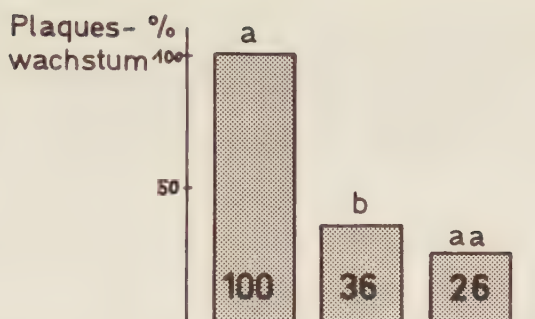


Abb. 3 aa = Zugabe der Leukozyten vor dem Virus

Bei der Mischung der Leukozyten mit dem Virus in vitro und ihrer Inkubation über 20 min (bb) kommt es zum Teil zu einer Cytolysereaktion. Wie jedoch auch andere Versuche (STICKL, unveröffentlicht) zeigten, werden von den Leukozyten, obwohl sie 2 mal gewaschen wurden, Serumproteine freigesetzt. Bei einem Tier auf der Höhe seiner vaccinalen Immunität können hierdurch auch neutralisierende Antikörper mit dem Virus zur Reaktion kommen und zu der beschriebenen, weitgehenden Plaquesreduktion führen. Damit befindet sich in diesem Versuchsansatz der gleiche Fehler, wie er in analogen Gewebekulturversuchen mit Leukozyten (STICKL, 1965) diskutiert wurde. Außerdem ist hierbei nicht abzugrenzen inwieweit das Virus durch die bereits einsetzende Cytolysereaktion selbst geschädigt wurde (Freisetzung proteolytischer Fermente und der Zellphosphatasen). Die Versuchsanordnung bb eignet sich daher nicht zur Bearbeitung des gesetzten Themas (Tab. 4, Abb. 4).

Tabelle 4.

Ansatz	Leerkontr. a		pos.Kontr. b		Fraktion, bb	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	55	100	14	25,5	2	3.6

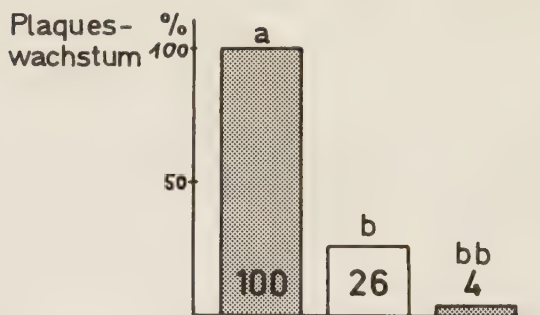


Abb. 4 bb = Leukozyten und Virus gemischt (20 min)

Die Versuchsanordnung cc, bei der das Virus mit den Leukozyten bei Raumtemperatur nur 3 min in vitro reagierte, wobei es noch zu keiner Cytolyse kommen kann, unterstreicht die Deutung des Versuches bb. Gegenüber dem anfangs beschriebenen Grundversuch läßt (abgesehen von einer methodischen Vereinfachung) diese Versuchsanordnung keine Vorteile erkennen (Tab. 5, Abb. 5).

Tabelle 5.

Ansatz	Leerkontr. a		pos. Kontr. b		Fraktion, cc	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	74	100	46	62.2	39	52.7

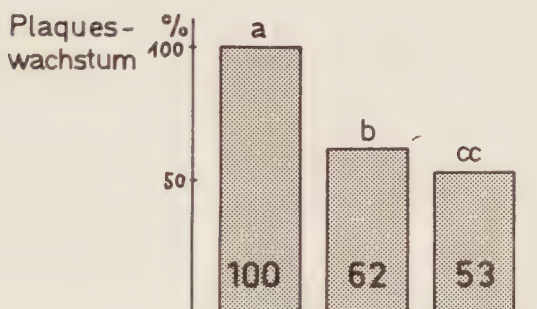


Abb. 5 cc = Leukozyten und Virus gemischt (3 min)

Eine Übersicht ergibt, daß der anfangs beschriebene Grundversuch sich in seiner Anordnung und in seinem Ergebnis am besten als "positive" Kontrolle eignet.

Aufarbeitung der Leukozyten.

Leukozytenfraktionen:

1. Um eine hemmende Wirkung des Komplements auszuschalten, wurden die Leukozyten 20 min auf 56° C erhitzt.
2. Zur Denaturierung der Glukoproteide war ein Erhitzen auf 80° C über 20 min erforderlich.
3. Die Leukozyten wurden in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert, so daß eine 20%ige Zellsuspension

sion, gemessen am Sedimentvolumen, entstand. Diese Suspension wurde 3 mal kurz aufeinanderfolgend eingefroren und wieder aufgetaut. Zur Verwendung kamen nach Zentrifugation des Ansatzes bei 3000 U/min über 40 min a) der zellfreie Überstand und b) das den Zelldetritus enthaltende Sediment.

4. Sedimentierte isolierte Leukozyten wurden mit einer 0,25%igen Trypsinlösung resuspendiert und 10 min bei 37° C inkubiert. Durch diese schonende Behandlung mit Trypsin wurden die Leukozyten morphologisch nicht verändert; bei Betrachtung der Zellsuspension in Hohl-schliffobjektträgern fiel auf, daß die suspendierten Zellen weniger verklumpten als die auf gleiche Art, jedoch ohne Trypsin, aufgearbeiteten Zellen. Die Cytolysereaktion (s. STICKL und ENGELHARDT) der Trypsin-behandelten Leukozyten von Vaccine-immunen Spendertieren war negativ.
5. Zur fermentativen Aufspaltung der Ribonucleinsäuren wurde Ribonuclease (RNase 15331, C.F. Boehringer und Soehne GmbH, Mannheim) verwendet. 100 mg RN-ase wurden in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und zu 12 ml der plasmahaltigen Leukozytensuspension gegeben. Sie wirkte 1/2 Stunde bei 37° C ein.
6. Extraktion der Nukleoproteide (RNS). Die isolierten und gewaschenen Leukozyten aus 20 ml Blut wurden in 10 ml 3m Kochsalzlösung resuspendiert, einmal eingefroren und wieder aufgetaut. Diese Suspension wurde bei Raumtemperatur so lange (mindestens jedoch 2 Std.) gerührt, bis sie eine sirupartige Konsistenz erhalten

hatte, und anschließend 14 Std. bei 4° C im Kühlschrank stehen gelassen. Nun erfolgte die Sedimentation des noch vorhandenen Zelldetritus. Im Überstand befanden sich die gelösten Nukleoproteide. Dieser wurde 5 Std. gegen Aqua dest. (6 maliger Wechsel) dialysiert, wobei die Nukleoproteide als weißliche Flocken ausfielen. Nach Zentrifugieren und Auswaschen in Aqua bidest. wurden sie in physiologischer Kochsalzlösung wieder gelöst. Die Zugabe der Nukleoproteide auf die gesenkten Eihäute erfolgte in einer Menge¹⁾ von 4,4 γ bzw. 1,5 γ (aus Zellen Vaccine-immuner Tiere) und mit 3,7 γ bzw. 1,2 γ (aus Zellen nicht immuner Tiere). Die Extraktionsmethode der RNS nach DIMROTH und JAENICKE, bei der die Zellsuspension bei einer Temperatur von 90° C extrahiert wurde, erfolgte in bewußter Modifikation (bei Raumtemperatur, + 22° C) um eine Denaturierung etwaiger, spezifischer immunologischer Eigenschaften der Ribonukleoproteide zu vermeiden; die wesentlich geringere Ausbeute an Ribonukleoproteiden, sowie die wahrscheinlich selektiv erfaßte, leicht lösliche "Messenger-RNS", wurde dabei in Kauf genommen.

7. Extraktion der Zellkerne mit Tween 80 (Ölsäure). Die isolierten Leukozyten wurden mit 10 ml 0,45%iger Kochsalzlösung und 7 % Tween 80 versetzt und 1/2 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Sedimentation der Zellkerne 1 Std. bei 3000 U/min.

1) Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Zillig danke ich für die Bestimmung der extrahierten Nukleoproteide.

Nach Dekantieren des Überstandes wurden sie ausgewaschen und in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Der daraufhin angefertigte und nach Giemsa gefärbte Kontrollausstrich zeigte neben geringem Zelldetritus eine große Anzahl nackter Kerne, einige Kerne mit beginnender Lysis und sehr wenig zerstörte Kerne.

8. Eine Extraktion der Zellkerne mit 2%iger Saponinlösung wurde durchgeführt. Jedoch ließ sich das Saponin offensichtlich nicht ausreichend von den Kernstrukturen eluieren; es starben durch die toxische Wirkung zu viele Embryonen ab, so daß eine Auswertung der Versuche nicht möglich war.
9. Quinacrine, ein im Ultraviolettlicht intensiv grünlich aufleuchtender DNS-Farbstoff, wurde in 0,8%iger Lösung verwendet. 3 ml hiervon wurden mit 6 ml Plasma und Leukozyten vermengt. Es kam 10 min während des Zentrifugierens zur Einwirkung. Eine Fraktion wurde zunächst mit Ribonuclease (s.b. 5.) und anschließend mit Quinacrine behandelt.

Um die Verteilung der Leukozyten auf der Eihaut besser verfolgen zu können, wurden sie in gleicher Weise mit Quinacrine markiert. Jedoch wurden für diesen Versuch die Eihäute 36 Std. vor Zugabe der markierten Zellen mit dem Vaccine-Virus infiziert. Nach weiteren 12 Std. wurden die Eihäute unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. In einem ähnlichen Versuch stellte sich die Frage, ob sich durch unvollständig ausgewaschenes Quinacrine die embryonalen Blutzellen anfärben würden. Um dies festzustellen, wurde 30 min nach Infektion

mit dem Vaccine-Virus 0,3 mg Quinacrine in 0,1 ml Lösung auf die Eihaut gebracht.

10. Zur Verringerung der negativen Oberflächenladung der aus heparinisiertem Blut isolierten Zellen wurden nach Zusatz von 0,1 % CaCl_2 zu 9 ml Plasma-Leukozytensuspension 500 E Neuraminidase ("RDE" - Receptor destroying enzyme - gereinigte Choleraneuraminidase der Behring-Werke, Hamburg) zugegeben; nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Leukozyten gewaschen. In ähnlicher Weise wurden zu den isolierten und im Plasma suspendierten Leukozyten aus je 10 ml Blut als Ausgangsmaterial 0,5 γ "Pyrexal" (Fa. Wander) zugegeben. In einem weiteren Versuch kam ein Pseudomonas-Polysaccharid (Piromen^R) zur Anwendung. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Leukozyten in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Die in den Tabellen 3 - 18 aufgeführten Zahlen wurden nach der Formel $\epsilon = \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{N(N-1)}}$ errechnet. Um jedoch einer biologischen Schwankungsbreite gerecht zu werden, wurden Zahlenwerte zu Grunde gelegt, die sich innerhalb des doppelten mittleren Fehlers (2ϵ) befanden. Um eine einheitliche graphische Darstellung zu ermöglichen (s. Abb. 3-6 u. 8-19) wurde die Plaqueszahl der Versuchsanordnung a (Infektion der Chorioallantoismembran mit durchschnittlich $0,8 \times 10^2$ PFU Vaccine-Virus) gleich 100 % gesetzt.

Die auf den Eihäuten sich abzeichnenden Ergebnisse wurden zum Teil fotografisch festgehalten: die Aufnahme erfolgte im Abstand von 30 cm mit Blitzlicht

auf Kodak-Farbnegativfilm. Die Eihäute wurden hierzu auf nicht reflektierenden, schwarzen Fotokarton aufgezogen.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde ein mit mehreren Plaques versehenes Eihautstück in der Flächengröße von etwa 1 cm^2 ausgeschnitten und auf entfettete Objektträger aufgezogen. Dieses Präparat wurde mit 50%iger Glycerin-Phosphatpufferlösung vom p_H 7,2 eingedeckt und bei Lupenvergrößerung (50 fach) bzw. 125 facher Vergrößerung (Objektiv 10 x) mit der Fluoreszenzeinrichtung (Fa. Wild) betrachtet. Mikrofotografische Aufnahmen erfolgten mit der Zeiss-Aufsetzkamera (Contax-System).

III. Beschreibung der Versuche:

- A. Infektion der Chorioallantoismembran mit Vaccine-Virus und Beeinflussung des Infektionsverlaufes durch Leukozyten.
1. Isolierte Leukozyten von immunen Kaninchen wurden im Wasserbad bei 56°C über 20 min erhitzt (s.b. Mat. u. Meth., S. 13). 30 embryonierte Hühnereier, bei denen die Eihaut wie beschrieben gesenkt worden war, wurden mit dem Virus und anschließend mit den Leukozyten beimpft. Die nach 48 Std. erfolgte Auszählung der Plaques ergab folgendes Ergebnis (Tab. 6, Abb. 6 u. 7):

Tabelle 6.

Ansatz	Leerkontr. a		pos.Kontr. b		Fraktion, c	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	24	100	4	16.7	6	25
2	39	100	31	79.5	31	79.5
3	74	100	46	62.2	56	75.7
a. M.		100		52.8		60.1

a.M. = arithmetisches Mittel

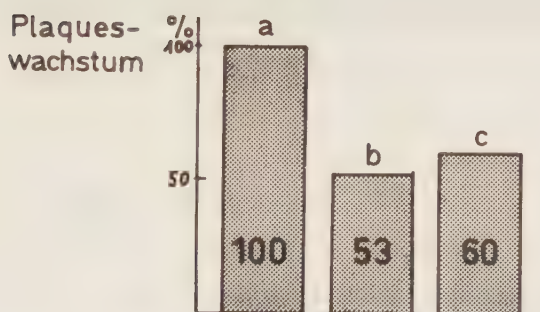


Abb. 6 In den Säulen sind die Durchschnittswerte eingetragen. a = Leerkontrolle; b = positive Kontrolle (Grundversuch); c = Leukozytenfraktion (auf 56° C erhitzt); Grundversuch (s.b. Mat. u. Meth., S. 6): die Eihäute wurden mit den isolierten, nicht anderweitig behandelten Leukozyten eines Vaccine-immunen Kaninchens beschickt.

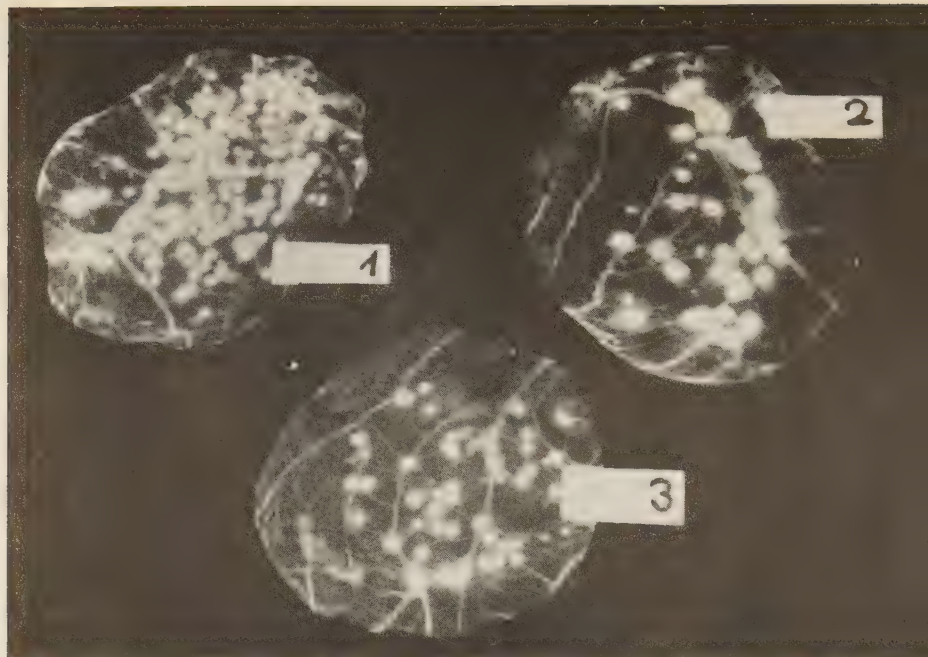


Abb. 7 Eihäute mit Vaccine-Virus-Plaques.

- 1 = keine Zugabe von Leukozyten bzw. einer Leukozytenfraktion;
- 2 = Zugabe von Leukozyten eines Vaccine-immunem Kaninchens;
- 3 = Zugabe einer Leukozytenfraktion (20 min erhitzt auf 56°C) eines Vaccine-immunem Kaninchens.

Ergebnis: die nur auf 56°C erhitzten Leukozyten führten noch zu einer Plaquesreduzierung von 40 %. Hieraus ergibt sich, daß der zellgebundene Immunfaktor nicht zu den hitze-labilen Komponenten des Immunsystems gehört, bzw. von ihnen abhängig ist (z.B. Komplement).

2. Leukozyten von einem Vaccine-immunen Kaninchen wurden im Wasserbad auf 80°C über 20 min erhitzt. Der Versuch wurde im übrigen wie der vorhergehende angesetzt (s.b. Mat. u. Meth., S. 13).

Tabelle 7.

Ansatz	Leerkontr. a		pos.Kontr. b		Fraktion, c	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	48	100	28	58,3	31	64.6
2	55	100	14	25.5	47	85.5
a.M.		100		41.9		75.1

a.M. = arithmetisches Mittel

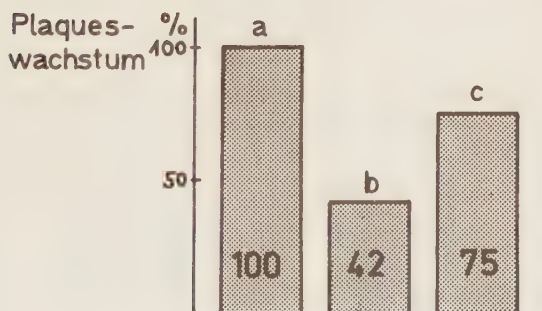


Abb. 8 c = Leukozytenfraktion (auf 80°C erhitzt)

Ergebnis: durch die Hitzedenaturierung bei 80°C wurde der zellgebundene Immunfaktor zerstört; es kam nur zu einer unwesentlichen Plaquesreduzierung (25 %).

3. a) Leukozyten eines Vaccine-immunen Kaninchens wurden gewonnen und wie beschrieben (s.b. Mat. u. Meth., S. 13) 3 mal innerhalb einer Stunde eingefroren und wieder aufgetaut (durch Einstellen in die Kühltruhe, kein Schockgefrieren). Die mikroskopische Kontrolle der Zellen ergab eine fast vollständige Zerstörung ihrer Strukturen. Diese Zelltrümmer wurden durch scharfes Zentrifugieren (40 min, 5000 g) sedimentiert und in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert, der Zentrifugatüberstand wurde in den Versuch 3 b (s.u.) eingesetzt. Die im Grundversuch ("positive" Kontrolle mit intakten Leukozyten des gleichen Vaccine-immunen Tieres) sichtbare Plaquesreduzierung tritt auch durch Verwendung der sedimentierten und gewaschenen Zelltrümmer auf. Der geringe Unterschied zwischen Grundversuch und Versuchsansatz c liegt innerhalb der Fehlerbreite (s. Tab. 8 u. Abb. 9).

Tabelle 8.

Ansatz	Leerkontr. a		pos. Kontr. b		Fraktion, c	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	78	100	5	6.4	7	9
2	70	100	6	8.7	7	10
a. M.		100		7.6		9.5

Versuch 3 a) a.M. = arithmetisches Mittel

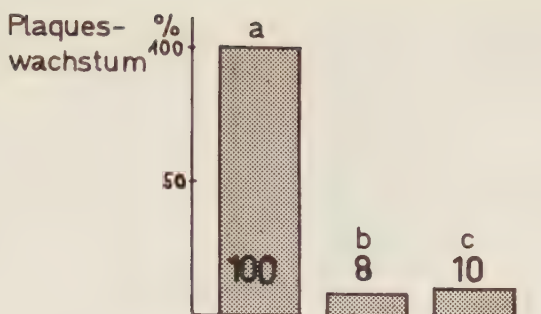


Abb. 9 Versuch 3 a) c = Leukozytenfraktion (3 x eingefroren und aufgetaut - Sediment)

b) Der Überstand aus 3 a wird in der gleichen Weise verwendet; dabei hat sich offensichtlich ein "Immunfaktor" von den festen Zellstrukturen abgelöst (zur Frage humoraler Antikörper; s. Diskussion). Die Plaquesreduzierung entspricht der "positiven" Kontrolle und ist sehr intensiv (s. Tab. 9 u. Abb. 10).

Tabelle 9.

Ansatz	Leerkontr. a		pos.Kontr. b		Fraktion, c	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	78	100	5	6.4	6	7.7
2	70	100	6	8.7	2	2.9
a.M.		100		7.6		5.3

Versuch 3 b) a.M. = arithmetisches Mittel

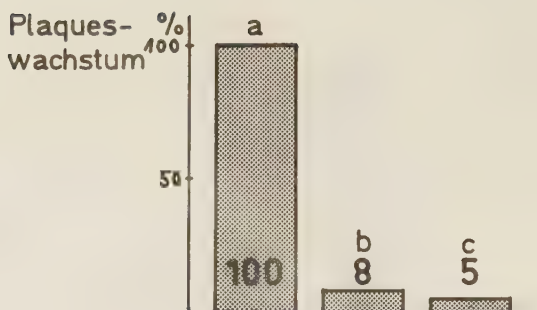


Abb. 10 Versuch 3 b) c = Leukozytenfraktion (3 x eingefroren und aufgetaut - Überstand)

4. Die Zellen wurden mit Trypsin wie beschrieben behandelt; ihre Fähigkeit zur Immuncytolyse wurde überprüft (s. Mat. u. Meth., S. 14). Nach Trypsinbehandlung wurde mittels Zellzählung die Zahl der Zellen pro mm^3 im Ansatz des Grundversuches (b) wie im Hauptversuch auf Gleichheit eingestellt. Die Plaquesreduzierung der Trypsin-behandelten Zellen erwies sich in 2 Versuchen mit je 7 bzw. je 9 Eiern pro Ansatz (a bzw. b bzw. c) als eindeutig besser wie im Grundversuch selbst. Diese Ergebnisse befinden sich innerhalb des 2 σ Wertes (s. statistisch bereinigte Werte in Tab. 10, Abb. 11).

Damit ergibt sich, daß die schonende Trypsinbehandlung die Fähigkeit von kompetenten Zellen, eine vaccinale Gewebeimmunität zu übertragen, nicht beeinträchtigt.

Tabelle 10.

Ansatz	Leerkontr. a		pos. Kontr. b		Fraktion, c	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	70	100	6	8.7	17	24.3
2	39	100	31	79.5	13	33.3
a.M.		100		44.1		28.8

a.M. = arithmetisches Mittel

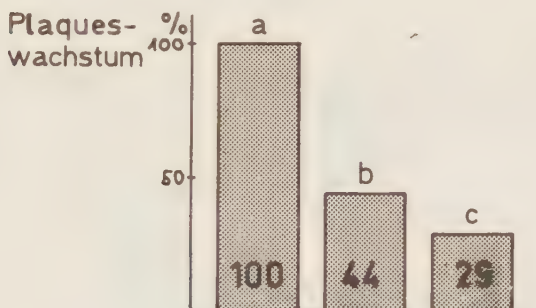


Abb. 11 c = Leukozytenfraktion (mit Trypsin behandelt)

5. 30 min bei 37° C mit Ribonuclease (8 mg/ml) inkubierte Leukozyten Vaccine-immuner Kaninchen (s. Mat. u. Meth., S. 14) wurden in üblicher Weise auf die infizierten Eihäute gebracht. Die Auszählung der Plaques nach 48 Std. zeigte eine nur unwesentliche Abweichung von der "positiven" Kontrolle (s. Tab. 11 u. Abb. 12).

Tabelle 11.

Ansatz	Leerkontr. a		pos.Kontr. b		Fraktion, c	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	34	100	27	79.1	14	41.2
2	153	100	91	59.5	95	62.1
3	101	100	47	46.5	52	51.5
a. M.		100		61.7		51.6

a.M. = arithmetisches Mittel

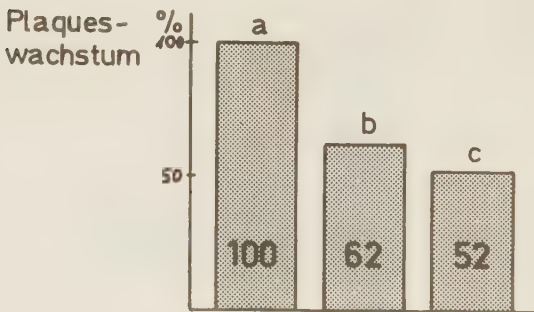


Abb. 12 c = Leukozytenfraktion (mit RNase behandelt)

Ergebnis: eine Übertragungsfunktion der Zellimmunität durch die Ribonucleinsäuren läßt sich durch dieses Versuchsergebnis nicht nachweisen. Der Transferfaktor der vaccinalen "Gewebeimmunität" wird durch Ribonuclease nicht zerstört.

6. a) Nukleoproteide (RNS) aus Leukozyten Vaccine-immuner und unvorbehandelter ("naiver") Kaninchen extrahiert (s. Mat. u. Meth., S. 14), wurden in einer Menge von 4,4 γ auf die gesenkte und infizierte Eihaut gegeben. Dieser Versuchsansatz wies, verglichen mit der Leerkontrolle (Grundversuch) ein stärkeres Viruswachstum auf. Ein bedeutender Unterschied zwischen Nukleoproteiden aus Leukozyten immuner und nicht immuner Tiere ergab sich hierbei nicht; c_2 entspricht der Leerkontrolle: Zugabe von 3,7 γ RNS (s. Tab. 12 u. Abb. 13).

Tabelle 12.

Ansatz	Leerkontr. a		pos.Kontr. b		Fraktion, c_1		Fraktion, c_2	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	56	100	14	25	99	176.7	38	67.8
2	78	100	18	23.1	74	94.7	69	88.5
a.M.		100		24.1		135.7		78.2

c_1 = Leukozytenfraktion von immunen Kaninchen

c_2 = Leukozytenfraktion von "naiven" Kaninchen

a.M. = arithmetisches Mittel

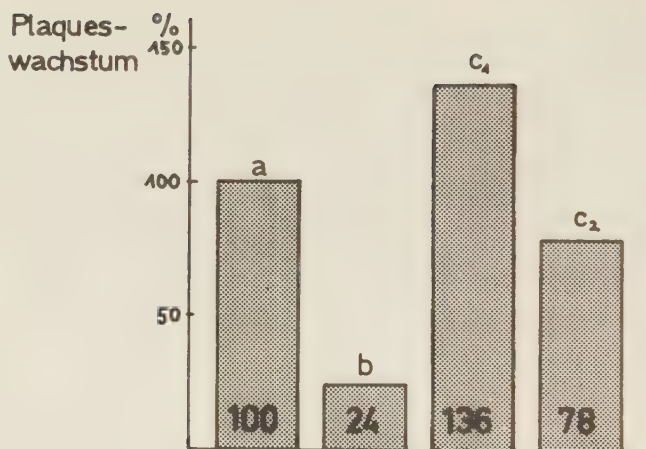


Abb. 13 c₁ = Leukozytenfraktion von immunen Kaninchen
 c₂ = Leukozytenfraktion von "naiven" Kaninchen

Ergebnis: die aus Leukozyten immuner wie auch "naiver" Kaninchen extrahierten Nukleoproteide fördern das Viruswachstum.

b) Der Versuch wurde in gleicher Weise mit einer geringeren Menge von Nukleoproteiden (bei c₁ 1,5γ, bei c₂ 1,2γ) durchgeführt. Das Ergebnis war nahezu gleich (s. Tab. 13 u. Abb. 14).

Tabelle 13.

Ansatz	Leerkontr. a		pos.Kontr. b		Fraktion, c_1		Fraktion, c_2	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	56	100	14	25	56	100	57	101.8
2	78	100	18	23.1	102	130.8	72	92.3
a.M.		100		24.1		115.4		97.1

c_1 = Leukozytenfraktion von immunen Kaninchen

c_2 = Leukozytenfraktion von "naiven" Kaninchen

a.M. = arithmetisches Mittel

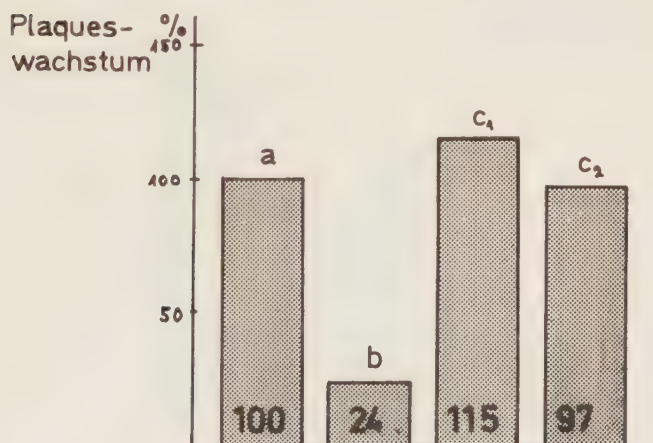


Abb. 14 c_1 = Leukozytenfraktion von immunen Kaninchen

c_2 = Leukozytenfraktion von "naiven" Kaninchen

7. Zellkerne wurden wie beschrieben mit Tween 80 (s.b. Mat. u. Meth., S. 15) aus Leukozyten immuner Kaninchen gewonnen und auf die Chorio-Allantois gebracht. Die nach

48 Std. erfolgte Auszählung der Virusplaques zeigte ein Ergebnis, das sich mit dem der extrahierten Nukleoproteide als identisch erwies. Das Viruswachstum wurde stimuliert (s. Tab. 14 u. Abb. 15).

Tabelle 14.

Ansatz	Leerkontr. a		pos.Kontr. b		Fraktion, c	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	47	100	12	25.5	67	142.6

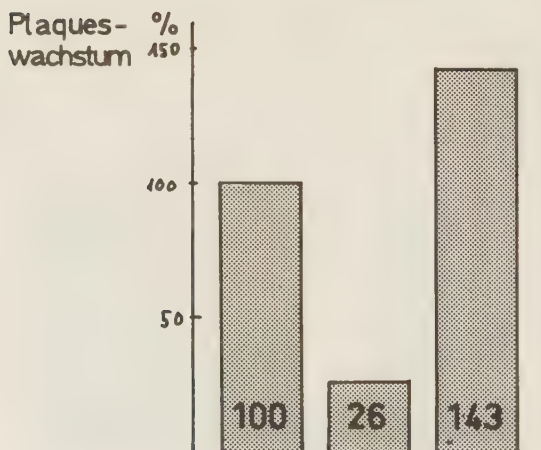


Abb. 15 c = extrahierte Zellkerne

8. a) Isolierte Leukozyten Vaccine-immuner Tiere wurden in gleicher Art mit RNase behandelt (s. Versuch 5); anschließend wurde Quinacrine zugesetzt (s. Mat. u. Meth., S. 16), so daß die Leukozytensuspension 2,5 mg/ml

enthielt. Die Leukozyten wurden nach 10 minütigem Kontakt mit dem Quinacrine 2 mal in der 100 fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Durch Quinacrine werden Nucleinsäuren, vor allem die DNS, gefärbt und denaturiert.

Tabelle 15.

Ansatz	Leerkontr. a		pos.Kontr. b		Fraktion, c	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	34	100	27	79.1	14	41.2
2	153	100	91	59.5	108	70.6
3	101	100	47	46.5	26	25.7
a.M.		100		61.7		45.8

a.M. = arithmetisches Mittel

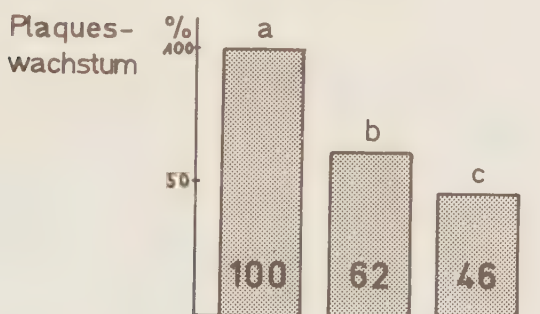


Abb. 16 c = Leukozytenfraktion (mit RNase und Quinacrine vorbehandelt)

Ergebnis: Das Ergebnis (s. Tab. 15 u. Abb. 16), gemessen an der Plaqueshemmung, entspricht beinahe demjenigen mit alleiniger RNase-Behandlung. Die Immuneigenschaften der

übertragenen Leukozyten wurden durch die fermentative und denaturierende Behandlung der Nucleinsäuren nicht eingeschränkt.

b) Da Quinacrine ein hochwirksames Zellgift darstellt und da diese Substanz von den Leukozyten an die Chorio-Allantoismembran abgegeben wird, wie fluoreszenzoptische Untersuchungen der Eihaut bewiesen, mußte eine Quinacrine bedingte Schädigung der Eihaut, die auf unspezifische Weise zu einer Plaqueshemmung führte, in Betracht gezogen werden. Das Ergebnis dieses Versuches (8 b) schließt diese Möglichkeit aus und läßt erkennen, daß eine Denaturierung der Nukleoproteide keinen Einfluß auf die immunologischen Transfereigenschaften der Zellen hat (s. Tab. 16 u. Abb. 17).

Tabelle 16.

Ansatz	Leerkontr. a		pos.Kontr. b		Fraktion, c	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	34	100	27	79.1	19	55.9
2	153	100	91	59.5	90	58.7
3	101	100	47	46.5	78	77.1
a.M.		100		61.7		63.9

a.M. = arithmetisches Mittel

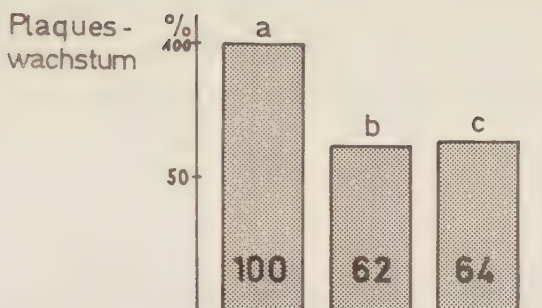


Abb. 17 c = Leukozytenfraktion (mit Quinacrine behandelt)

In einem weiteren ergänzenden Versuch wurde nach Infektion der gesenkten Eihäute anstatt Leukozyten Quinacrine in einer Menge von 0,3 mg je Ei bzw. Chorio-Allantoismembran zugegeben. Eine Plaquesreduzierung kam nicht zustande, jedoch waren die kernhaltigen Blutelemente des Hühnerembryos zum Teil mit Quinacrine gefärbt und wiesen im Fluoreszenzlicht eine starke Grünfluoreszenz auf. Die um die Plaques und entlang den Gefäßen sichtbaren Zellinfiltrationen waren ebenfalls durch Quinacrine fluorochromiert (s.a. Abb. 21)

9. Da sich bei Betrachtung der vorangehenden Versuche die Übertragungseigenschaften in den randständigen Regionen der Zellen vermuten ließen, wurde im folgenden Versuch die negative Oberflächenladung herabgesetzt, indem saure Zellmembranbestandteile abgespalten oder blockiert wurden.

a) Die Leukozyten wurden 30 min bei 37° C mit Neuraminidase (s. Mat. u. Meth., S. 17) inkubiert und gewaschen, der infizierten Eihaut zugegeben; nach 48 Std. wurden

die Plaques ausgezählt. Dabei zeigte sich zwar eine etwas geringere, jedoch noch signifikante Hemmung durch die Ferment-behandelte Leukozytenfraktion als durch die unvorbehandelten Leukozyten (s. Tab. 17 u. Abb. 18).

Tabelle 17.

Ansatz	Leerkontr. a		pos. Kontr. b		Fraktion, c	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	37	100	8	21.6	23	62.2
2	24	100	4	16.7	4	16.7
3	61	100	29	47.5	44	72.2
a.M.		100		28.6		50.4

a.M. = arithmetisches Mittel

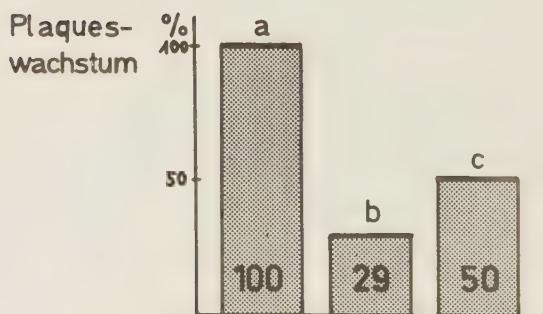


Abb. 18 c = Leukozytenfraktion (mit Neuraminidase behandelt)

b) In gleicher Weise wurden die Leukozyten mit Lipopolysaccharid von *Brucella abortus equi* (Pyrexal^R) bzw. einem *Pseudomonas*-Polysaccharid (Piromen^R) behandelt. Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsansätze entsprachen demjenigen aus Versuch 9 a (s. Tab. 18 u. Abb. 19).

Tabelle 18.

Ansatz	Leerkontr. a		pos. Kontr. b		Fraktion, c	
	PFU	%	PFU	%	PFU	%
1	37	100	8	21.6	37	100
2	24	100	4	16.7	4	16.7
3	61	100	29	47.5	31	50.8
a. M.		100		28.6		55.8

a. M. = arithmetisches Mittel

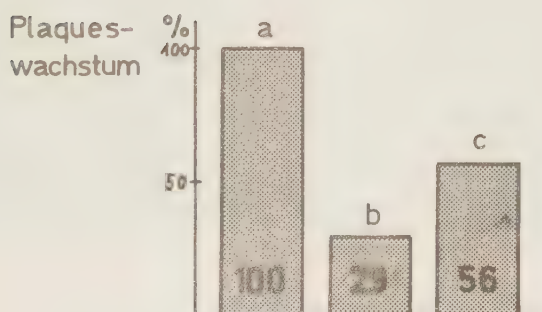


Abb. 19 c = Leukozytenfraktion (mit Pyrexal behandelt)

B. Verteilung der Leukozyten auf der Eihaut.

36 Std. nach der Infektion der Eihäute mit dem Vaccine-Virus wurden für 12 Std. mit Quinacrine markierte Leukozyten immuner und nicht immunisierter ("naiver") Spender-tiere zugegeben. Bei der Betrachtung der auf große Objektträger aufgezogenen und eingedeckten Eihäute (s. Mat. u. Meth., S. 18), ließen sich im Fluoreszenzmikroskop die grünlich aufleuchtenden Zellen besonders an den Rändern der Virusplaques und entlang den Gefäßen feststellen (s. Abb. 20). Da die Leukozyten von immunen und "naiven" Kaninchen die gleiche Fähigkeit zur Anlagerung an die Plaques zeigten, ist zu vermuten, daß es sich in erster Linie um eine generelle "Leukotaxis" bzw. Chemotaxis der Leukozyten zum Entzündungsherd, dem Plaque, handelt. Eine besondere Affinität der Immunzellen zum korrespondierenden Antigenherd (Plaque) ist aus diesen Versuchen nicht abzulesen. Möglicherweise sind die zellgebundenen Immuneigenschaften zu tief in den Grundstrukturen der Zelle verankert, daß sie nicht in einer spezifischen chemotaktischen Form zu Tage treten.

Daß die angelagerten Zellen jedoch nicht nur eingebrachte Leukozyten darstellten, ließ sich durch alleinige Zugabe von Quinacrine auf die infizierten Eihäute zeigen (s. III, A 8). Mit einer geringen Quinacrinedosierung werden die kernhaltigen Blutzellen des Hühnerembryos, und wie sich in Ausstrichen zeigte, in erster Linie die weißen Blutzellen fluoreszenzmarkiert. Nach 48 Std. ließ sich auch hier die beschriebene Anlagerung feststellen (s. Abb. 21).



Abb. 20 Anlagerung der mit Quinacrine markierten Leuko-
zyten an einen Virus-Plaque (Vergr. 100fach).



Abb. 21 Mit Quinacrine markierte foetale Blutzellen,
die manschettenartig um ein Gefäß der Eihaut
liegen (Vergr. 310fach).

C. Zusammenfassung der Ergebnisse.

Um den Überblick über die durchgeführten Versuche zu erleichtern, wurden die Ergebnisse hieraus in Tabelle 19 übersichtlich zusammengestellt. Dabei entspricht die Rubrik "Immuntransfer" der Hemmung des Viruswachstums durch die Leukozytenfraktionen. Die hierbei verwendeten Zeichen bedeuten:

- Ø keine Hemmung des Viruswachstums
bzw. Wachstumsförderung (s. Versuche);
- + Hemmung von 20 bis 30 %;
- ++ Hemmung bis 40 %;
- +++ Hemmung bis 50 %;
- ++++ Hemmung über 50 %.

Tabelle 19.

Ver = such Nr.	Seite	Vorbehandlung der Leukozyten Vaccine - immuner Spender	„Immuntransfer“
0	6	GRUNDVERSUCH (keine Vor = behandlung der Leukozyten)	++++
1	18	erhitzt auf 56°C	++
2	21	erhitzt auf 80°C	+
3a	22	3x eingefroren und aufge = taut — Sediment	++++
3b	23	3x eingefroren und aufge = taut — Überstand	++++
4	24	inkubiert mit Trypsin	++++
5	25	inkubiert mit RNase	+++
6a,b	27	RNS extrahiert	∅
7	29	Zellkerne extrahiert	∅
8a	30	mit RNase inkubiert und mit Quinacrine versetzt	++++
8b	32	versetzt mit Quinacrine	++
9a	33	inkubiert mit Neuraminidase	+++
9b	35	inkubiert mit Pyrexal ^a bzw. Piromen ^a	+++

IV. Diskussion:

Die spezifischen Reaktionsantworten des Körpers auf eingedrungene Erreger und ihre Antigene spielen in der Infektionsabwehr eine große Rolle. Hierbei lassen sich prinzipiell zwei immunologische Systeme unterscheiden:

1. die an Serumantikörper gebundene humorale Immunität und
2. die zellständige Gewebeimmunität.

Der humoralen Immunität zählen wir z.B. die antitoxische Immunität, etwa gegen Diphtherie, zu. Auf das Tuberkel-Bakterium dagegen reagiert der Körper mit einer Zell- und Gewebeallergie vom verzögerten Typ, die auch nach diesem Modell ganz allgemein "Tuberkulin-Typ-Allergie" genannt wird; Serumantikörper sind hierbei - sofern überhaupt vorhanden - fast ohne Bedeutung. So bestehen z.B. bei der Bang'schen Erkrankung des Menschen und der Tiere interessante Wechselbeziehungen zwischen humoraler und geweblicher Immunität (HOLLAND und PICKETT; POMALES-LEBRÓN und STINEBRING): nach der Desensibilisierung des Körpers mit Brucellergen in vivo und in vitro (Leukozyten in Kulturen mit Bang-Bakterien) ist ein deutlicher Gewebeimmunschutz gegen die Infektion mit Bang-Bakterien nachzuweisen. Durch Hitze abgetötete Bang-Bakterien bilden noch humorale Antikörper, es kommt aber zu keiner Gewebeallergie und -immunität mehr (s. HOLLAND und PICKETT).

Der Unterschied zwischen humoraler und geweblicher Immunität kann auch durch die Reaktion auf den Erreger definiert werden: eine Immunität durch humorale Antikörper wird angenommen, wenn das pathogene Antigen,

d.h. der Erreger, neutralisiert wird (HANSEN). Bei der geweblichen Immunität kann dagegen noch ein Krankheitsherd mit lebenden Erregern bestehen (vgl. F. SCHMID: zur Gewebeimmunität der Tuberkulose); diese werden aber in ihrer schrankenlosen Ausbreitung und Vermehrung ohne Beisein von humoralen Antikörpern gehemmt. Das Wesen der BCG-Impfung ist z.B. durch diese Immuneigenschaften der Gewebe gekennzeichnet. Auch bei vorhandener vaccinaler Grundimmunität, etwa beim Wiederimpfiling, kommt es nicht mehr zur Generalisation bei einer erneuten Vaccineinfektion.

Die Rolle beider Immunsysteme und ihre jeweiligen Besonderheiten gehen nicht nur aus der ontogenetischen Immunitätsentwicklung (O. GÜNTHER) hervor, sondern sie werden auch bei bestimmten Defekten sichtbar: so kann bei einem Antikörpermangelsyndrom die vaccinale Immunreaktion vollkommen normal verlaufen (KEMPE; HORSTER), während bei anderen Infektionskrankheiten (z.B. Staphylokokkeninfektionen) die Patienten gewöhnlich aufs äußerste gefährdet sind. Ähnliches gilt für die Tuberkulinreaktion, die zu etwa 20 bis 30 % bei tuberkulösen Kindern mit Antikörpermangelsyndrom ein normales Bild der Gewebsreaktion zeigt (F. SCHMID; BARANDUN und Mitarbeiter).

Umgekehrt kann es bei ausreichendem Vorhandensein humoraler Antikörper zu einer letal endenden Vaccineinfektion kommen, wenn die Gewebeabwehr defekt ist (GOOD, KELLY, RÖTSTEIN und VARCO). Analoge Verhältnisse liegen bei der Lymphogranulomatose, sowie beim Lymphosarkom vor (P. BAUM und K.H. MEYER zum BÜSCHENFELDE; Lit. s.b. STICKL und ENGELHARDT). So war früher die Verschlechterung

der Lungentuberkulose und der tuberkulösen Meningitis bei Masern gefürchtet. Vor Beginn der Antibioticabehandlung sah man das Auftreten der Tuberkulose bei der Lymphogranulomatose und bei der Sarkoidose sehr oft. Pilzinfektionen stellen bei Morbus Hodgkin eine häufige Komplikation dar. Auch konnten Brucellen aus Lymphknoten Brucellergen-negativer Personen mit Sarkoidose gezüchtet werden, obwohl sie einen hohen Serumantikörpertiter gegen die Brucellen aufwiesen (Lit. s.b. ARNASON und WAKSMAN; s.a. AISENBERG; F. SCHMID). Cortison hemmt sowohl die gewebliche Immunabwehr wie die Interferonbildung; der ungünstige Verlauf von Varicellen und der Vaccineinfektion bei Cortisonmedikation geht überwiegend auf eine solche pharmakologische Hemmung der Zell- und Gewebeimmunität zurück (s.b. A. MAYR, 1965). Nach Röntgen-Bestrahlung kann der Organismus zwar noch humorale Antikörper bilden, aber die Zell- und Gewebeallergie bzw. -immunität geht verloren (LENNOX, DEMPSTER und BOAG; UHR und SCHARFF).

KEMPE (1960) konnte bei einem an Vaccinia gangraenosa erkrankten Kind zeigen, daß i.v. Injektionen von Hyperimmunserum und Leukozytensuspensionen auf den Prozeß ohne Wirkung blieben. Erst als er mit dem Leukozytenkonzentrat eines Vaccine-immunen Spenders die Gangränränder subcutan infiltrierte, kam die Gangrän zum Stehen und der Defekt heilte aus. Bemerkenswert ist, daß sich in der Regel eine Tuberkulinallergie mit Zellen generalisiert übertragen läßt (SPIESS), bei dem von KEMPE beschriebenen Fall jedoch nur eine lokale Übertragung der zellgebundenen Immunabwehr gelang. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen STICKL, GOETZ und

TRAUZETTEL bei Versuchen mit der vaccinalen Allergie. Diese passive Übertragung einer zellulär-geweblichen Abwehr nennen wir einen "Transfer der Gewebeimmunität". Im gleichen Sinne berichtet SZABO-SOMOGYI, daß der Ausfall des einen Abwehrsystems nicht vollständig durch ein anderes kompensiert werden kann.

Die Bedeutung der Zell- und Gewebeallergie für die Klinik der Variola- und Vaccineinfektion gehört zwar zum bewährten ärztlichen Erfahrungsschatz. Jedoch ist fast nichts bekannt, wie diese spezifischen Zell- und Gewebeeigenschaften zustandekommen.

Auf Grund klinischer Erfahrungen wurde dabei vorausgesetzt, daß es sich bei der Gewebeallergie und -immunität um parallele oder sogar um prinzipiell identische Vorgänge handele: schließlich müsse ein Gewebe, daß zu zell- und gewebeallergischen Reaktionen fähig sei, auch imstande sein eine "Gewebeimmunität" aufzubauen. So setzt z.B. die Prüfung des Erfolges einer Tuberkuloseschutzimpfung mit den Tuberkulinproben diese Annahme als richtig voraus. Dabei weist der Kliniker im strengen Sinne der Definition nur die "Gewebeallergie" (Tuberkulin-Typ-Reaktion) nach.

Zu der Prämisse einer funktionellen Identität von Gewebeimmunität und Gewebeallergie trug die vor allem von LETTERER vertretene Hypothese bei, wonach allergische Reaktionen nichts anderes als eine Vorstufe der "vollen" Immunität seien. Hierfür ergeben sich zwar für das humorale Immunsystem mit seinen Reaginen und Antikörpern (γ -A-Globulin) vom Sofort-Typ klinische und experimentelle Hinweise (s.b. SORKIN): die ausgebildete Antikörperimmunität ist demnach

als Endstufe der humoralen Immunität anzusehen; gekennzeichnet ist sie durch die sog. "positive Anergie" und die ausreichende Anwesenheit von γ -G-Globulin. Es fehlen jedoch klinische und experimentelle Daten, die einen Analogieschluß vom humoralen auf das geweblich-zelluläre Immunsystem zulassen. Ebenso steht noch der Beweis aus, ob für die zellulär-gewebliche Allergie und Immunität die gleichen Voraussetzungen gelten wie für die humorale Immunität.

LURIE versuchte zwar schon 1942 einen solchen Nachweis zu führen, indem er die Monozyten von tuberkulin-positiven und von nicht sensibilisierten Kaninchen gewann und sie mit Tuberkel-Bakterien in Kontakt brachte. Die Monozyten mit den phagozytierten Tuberkel-Bakterien spritzte er in die vordere Augenkammer nicht sensibilisierter und bisher nicht infizierter Tiere. In dem einen Auge, in dem sich die Monozyten eines immunen Spenders mit den Tuberkel-Bakterien befanden, war das Keimwachstum deutlich geringer als in dem Auge mit den Monozyten eines nicht sensibilisierten Tieres. Da jedoch weiße Blutzellen von Tuberkulin-positiven Spendern bei Kontakt mit den Tuberkel-Bakterien und ihren Stoffwechselprodukten erhebliche Zellveränderungen, zuerst im Sinne einer Stimulation sodann jedoch in Richtung einer tiefgreifenden Zellschädigung, bzw. Cytolyse (FAVOUR; CHASE; Lit.s.b. F. SCHMID) durchmachen, ist anzunehmen, daß der von LURIE beschriebene Effekt zum großen Teil auf eine geringere Keimphagozytose der beschriebenen Zellen zurückzuführen ist. Er kann nicht allein mit einer Zellimmunität in Zusammenhang gebracht werden. Kontrollen in dieser Richtung fehlen. Bei der Vaccineimmunität hat sich sogar ergeben,

daß weiße Blutzellen von Vaccine-immunen Spendern eher weniger Virus adsorbieren und in sich aufnehmen (Immunfluoreszenzuntersuchungen: STICKL, sowie TRAUZETTEL). Jedenfalls kann das Modell der zu den humoralen Antikörpern zählenden spezifischen Opsoninen nicht auf die Zellimmunität übertragen werden. Die Reproduktion der Versuchsanordnung von LURIE am Kaninchenaugen gelang mit Vaccine-Virus nicht (STICKL, 1966, unveröffentlicht). Auch MIESCHER konnte zeigen, daß das korrespondierende Antigen nicht stärker an den Transferfaktor adsorbiert wird.

Ferner stellte BIRKHAUG fest, daß die Tuberkulinallergie nach BCG-Impfung früher verloren geht als die erworbene Immunität und daß sie voneinander experimentell trennbare Vorgänge sind. Auf Grund klinischer Erfahrungen äußerte WALLGREN eine ähnliche Vermutung, nämlich daß es sich bei der Gewebeimmunität und bei der Gewebeallergie nicht unbedingt um identische Vorgänge handeln müsse (s.a.b. ELBERG). STRÖM vermutete nach Versuchen mit radioaktiv markierten BCG, daß in bestimmten Fällen die spezifische Immunität nicht unbedingt mit einer Tuberkulinallergie einhergehen müsse.

In den eigenen Versuchen gelang mit einer neu ausgearbeiteten Methode der Beweis, daß Gewebeimmunität und Gewebeallergie voneinander getrennte Vorgänge darstellen und funktionell wie strukturell verschiedenartig in den Zellen verankert sind. Die Gewebeallergie ist an die oberflächlichen Zellstrukturen gebunden; sie läßt sich durch schonende Behandlung von isolierten immun-kompetenten Blutzellen mit Trypsin (s. III, A 4) vollständig ausschalten (s.b. STICKL); damit konnten ausschließlich die Immuneigenschaften dieser Zellen untersucht werden. Diese Eigen-

schaften werden definiert als die Fähigkeit von Zellen und Geweben die schrankenlose Vermehrung von Vaccine-Virus in empfänglichem Gewebe zu hemmen, ohne daß nachweisbare humorale Antikörper vorhanden sind. Nur mit sog. "immun-kompetenten Zellen" oder deren Fraktionen lassen sie sich passiv übertragen. Sie sind fest an die Zellstrukturen gebunden und haben zum Ribonucleinsäure-System des Protoplasmas wie zum Zellkern keine Beziehungen (s. III, A 6 u. A 7). Ihre relative Hitzebeständigkeit weist ihre Unabhängigkeit vom Komplementsystem aus (s. III, A 1) und läßt vermuten, daß es sich um Kohlehydrat-gebundene Proteine handelt; denn auch nach Erhitzen auf 80° C bleibt immer noch ein Teil dieser zellgebundenen Immuneigenschaften erhalten (s. III, A 2). Die Verwendung von Zellfraktionen, das anschließende energische Waschen der Zellaufarbeitungen und die Entfernung der "cytophilen Antikörper" (s.u.) durch Trypsin ergibt die größtmögliche Gewähr, daß humorale Antikörper nicht mehr vorhanden sind (s. III, A 4). Hinzu kommt, daß durch einen sehr großen Verdünnungsfaktor evtl. noch vorhandene und an Zellstrukturen adsorbierte Antikörper soweit ausverdünnt werden, daß ihre Virus-neutralisierende Wirkung vernachlässigt werden kann. Nach Eingabe der Zellfraktionen auf die ca. 45 - 60 g wiegenden embryonierten Eier erfolgt eine Verdünnung der löslichen und ins ganze Ei eindiffundierenden Bestandteile des 0,1 ml umfassenden Inoculums auf ca. 1:450 bis 1:600. Die neutralisierenden Antikörper je 1 ml Kaninchenserums hatten zum Zeitpunkt der Versuche jedoch nur einen Titer von 1:16 bis 1:64, und ausnahmsweise bis 1:128. Aus dieser

quantitativen, überschlagsmäßigen Untersuchung der maximal möglichen, in den Versuch gelangten neutralisierenden Antikörper, geht hervor, daß die vorliegenden Ergebnisse mit festen Zellfraktionen nicht durch humorale, neutralisierende Antikörper beeinflusst werden konnten.

Die cytophilien Antikörper nach BOYDEN und SORKIN lassen sich durch Trypsinbehandlung vollständig entfernen (s. STICKL). Sie sind hauptsächlich für die Phänomene der "Zellallergie" verantwortlich. Eine Neuproduktion von Antikörpern durch überlebende und übertragene weiße Blutzellen ist zwar theoretisch vorstellbar; sie spielt jedoch bei der vorliegenden Versuchsanordnung keine Rolle, da nach Abtöten der Zellen durch Erhitzen (s. III, A 2) noch Immuneigenschaften erhalten blieben. Durch Frieren und Auftauen der Zellen (s. III, A 3) waren diese Immuneigenschaften auch im zellfreien Überstand in unveränderter Stärke nachweisbar.

Durch Frieren und Auftauen von immun-kompetenten Zellen konnte ein ins Medium abgegebener gelöster Faktor untersucht werden (STICKL, 1965), der weitgehend die Eigenschaften des von LAWRENCE bei der Tuberkulin-Allergie beschriebenen "Zellallergiefaktors" teilt. Dieser zellfreie "Leukozyten-immunfaktor" lagerte sich fest an die Gewebekulturzellen an und ließ sich durch Waschen und Mediumwechsel nicht mehr entfernen. Bei einer nachfolgenden Infektion der Gewebekulturen mit Vaccine-Virus kam es zu einer erheblichen Reduktion der Plaqueszahlen. Der Einfluß humoraler, in erster Linie neutralisierender Antikörper, vor allem aber der als Sonderform humoraler Antikörper anzusprechenden "cytophilien

Antikörper" (Virus-neutralisierende Eigenschaften?) konnte nicht befriedigend ausgeschlossen werden. Die hier angewendete Methode mit Zellfraktionen immun-kompetenter und mit Trypsin gereinigter Zellen weist gegenüber der von STICKL durchgeführten Versuchsanordnung den Vorteil auf, daß der Einfluß neutralisierender Antikörper oder cytophiler Antikörper im Sinne von BOYDEN und SORKIN auf die Gewebe ausgeschlossen werden konnte. Ihr ist daher für die Untersuchung der zellgebundenen Immunität der Vorrang zu geben.

Durch Neuraminidase und bakterielle Lipopolysaccharide (Pyrexal^R bzw. Piromen^R) lassen sich zwar die für die Allergie verantwortlichen Faktoren hemmen. Die Fähigkeit zur Cytolysereaktion geht hierbei stark zurück oder sogar gänzlich verloren. Eine Veränderung der Leukozytenoberfläche, die zum Verlust der Immuncytolysefähigkeit führt, müßte, wenn engere Beziehungen zwischen der an den Zellstrukturen verankerten Gewebeeimmunität bestehen, sich auch im Immunitätsbelastungsversuch ausdrücken. Daß dies aber nicht der Fall ist, zeigen die vorliegenden Versuche. Andererseits ist es bei einer zusätzlichen Behandlung der Leukozyten nicht verwunderlich, wenn im Zuge der damit verbundenen Denaturierung auch die funktionellen Eigenschaften, hier die Fähigkeit zum geweblichen Immuntransfer, betroffen werden. Da nach Behandlung der Leukozyten mit Neuraminidase das Plaqueswachstum etwas stärker war als bei den unvorbehandelten Leukozyten muß außerdem erwogen werden, ob nicht unspezifische, an Neuraminsäure-haltige Mucoproteide gebundene Resistenzfaktoren (s. STICKL und AUFGKOLK) durch

die Neuraminidase zerstört werden. Die Versuche mit Lipopolysacchariden, die bekanntlich nicht Neuraminidase-aktiv sein können, sprechen allerdings gegen diese Annahme und geben der Vermutung recht, daß die Immuneigenschaften der Leukozyten durch die zusätzlichen Manipulationen funktionell geschädigt wurden.

Als Nebebefund ist zu erwähnen, daß die mit Quinacrine markierten Zellen, wie auch foetale Leukozyten des Hühnerembryos sich den Plaques anlagern. Eine besondere Affinität immun-kompetenter Zellen zu den Antigenherden ist hieraus jedoch nicht abzulesen. Der Versuch (s. III, B) zeigt aber, daß schon foetale Gewebe zu Entzündungsreaktionen fähig sind und mit Leukotaxinen (?) eigene und transferierte Zellen anlocken (s. Abb. 20). Auffallend ist ferner, daß die Leukozyten förmliche Manschetten um die herdnahen kleinen Blutgefäße bilden (s. Abb. 21), - ein Bild, das beinahe an die perivenolösen Rundzellinfiltrationen gewebshallergischer Entzündungen erinnert. Weitere Untersuchungen müssen ergeben, ob dieses Versuchsmodell geeignet ist, bestimmte pathologische Mechanismen, etwa die der sog. perivenösen Herdencephalitis (SPATZ), zu untersuchen.

Auf die mögliche Auswertung dieser Versuche für klinisch praktische Zwecke sei im folgenden hingewiesen.

So bietet sich z.B. die beschriebene Methode der getrennten Untersuchung der Gewebeallergie und der Gewebimmunität an, die geweblich übertragbaren und isolierten Immuneigenschaften für die Wertbemessung von Pockenschutzimpfstoffen einzusetzen. Pockenschutzimpfstoffe konnten bisher nur im Belastungsversuch am Menschen in Pocken-

endemiegebieten auf ihre protektive Wirksamkeit gegen Variola getestet werden. Dieses Vorgehen mußte naturgemäß mit vielen Mängeln behaftet sein. Auch stand seine Umständlichkeit, Unsicherheit und Schwierigkeit (Menschenversuch!) einer Weiterentwicklung und Verbesserung der Pockenschutzimpfstoffe im Wege. Die für den Schutz gegen die Variolainfektion in erster Linie verantwortliche Gewebeimmunität ließ sich im Laborversuch bisher nicht messen oder austesten. Mit der Methode, Leukozyten definiert Vaccine-immuner Spender-tiere zu verwenden und ihren Einfluß auf die experimentelle Infektion der gesenkten Eihaut mit Variola-Virus zu studieren erscheint es möglich unter den zahlreichen immunogenen Vaccine-Stämmen denjenigen auszuwählen, der für die Pockenschutzimpfung am geeignetsten ist. Außerdem wäre eine Kontrolle der geweblichen Variolaimmunität einzelner geimpfter Menschen anhand des "Immuntransfers" mit ihren isolierten Blutzellen möglich, ohne diese Menschen einer Variolainfektion aussetzen zu müssen. Da es bisher keine geeignete Methode der Impfstoffwertbemessung außer der Belastung durch die Pockeninfektion gibt, ist es weiterer Versuche wert nachzuprüfen, inwieweit die bisher beschriebene Methode sich für eine solche Wertbemessung verwenden läßt.

Das hier ausgearbeitete Modell kann aber auch zur Austestung gewebeimmunogener Eigenschaften anderer Impfstoffe herangezogen werden. So bestehen z.B. klinisch wichtige Wechselbeziehungen zwischen dem Stand der Gewebeimmunität und dem Antikörpertiter bei der Herpes-simplex-Infektion. Trotz hohen neutralisierenden Serumantikörpertiters kann aus verschiedenen Anlässen eine Herpes-simplex-Viruser-

krankung zum Ausbruch kommen (RHODES, van ROYEN). Ihre klinische Manifestation reicht von der Solitäraraphte und dem Herpes labialis bis zur Generalisation und zur Einschlußkörperchenencephalitis nach PETTE-DÖRING bzw. DAWSON. Offensichtlich bestehen zwischen der allgemeinen unspezifischen Resistenzlage des Organismus und der spezifischen Gewebeabwehr enge Wechselbeziehungen, wobei im Falle der Herpes-simplex-Virusinfektion den humoralen Antikörpern nicht die entscheidende Rolle im Erkrankungsverlauf zuzusprechen ist (s.b. NASEMANN). Das Wecken der an die Gewebe anamnestisch verankerten Grundimmunität durch eine Virus-totvaccine kann nach NASEMANN die Erkrankung wieder in das heute noch rätselhafte Stadium der geweblichen Virus-latenz zurückdrängen. Das Herpes-simplex-Virus ergibt auf der gesenkten Eihaut charakteristische, paravasal gelegene Plaques.

Es ist vorstellbar, daß mit der beschriebenen Methode oder mit einer Modifikation derselben, sich die zellgebundenen Immunitätsverhältnisse gegenüber anderen, durch Viren und Bakterien bedingte Erkrankungen auch untersuchen lassen. Eine Reproduktion der bereits zitierten LURIE'schen Ergebnisse mit der Tuberkulose-Infektion in Hinblick auf die Gewebeimmunitätsverhältnisse nach der Tuberkulose-Schutzimpfung mit BCG wäre z.B. erwägenswert.

Als Erkenntnis für die theoretische Immunitätslehre kann aus den hier durchgeführten Versuchen entnommen werden, daß es sich bei der Gewebeallergie und bei der Gewebeimmunität um grundsätzlich verschiedene Immunmechanismen handelt. Allergie und Immunität beim humoralen System (s.o.)

können dagegen als verschiedene graduelle Stufen des prinzipiell gleichen Vorganges angesehen werden.

Diese Versuche zeigten außerdem, daß die Gewebeimmunität unabhängig von humoralen Antikörpern ist und offensichtlich ein selbständiges System der spezifischen Abwehr darstellt.

V. Zusammenfassung:

Die spezifische vaccinale Gewebeimmunität ließ sich durch Zellen und Zellfraktionen Vaccine-immuner Kaninchen auf ein fremdes Gewebe, die Chorioallantois embryonierter Hühnereier, übertragen. Das Plaqueswachstum des Vaccine-Virus wurde hierdurch deutlich eingeschränkt. Dieser an den Zellstrukturen fest verankerte Immunfaktor erwies sich

- als nicht eluierbar und durch Behandlung mit Trypsin nicht ablösbar,
- auch nach Frieren und Auftauen fest mit den Zellstrukturen verhaftet,
- hitzestabil bis 56° C,
- und relativ hitzebeständig bis 80° C,
- unabhängig vom Ribonucleinsäure-System und der Desoxyribonucleinsäure, was sich durch Behandlung mit Ribonuclease und Quinacrine und durch Extraktion der Nukleoproteide zeigen ließ,
- als nicht an den Zellkern gebunden,
- und nicht an die Zelloberfläche, bzw. ihren elektro-negativen Eigenschaften gebunden (Behandlung mit Neuraminidase und bakteriellen Polysacchariden).

Durch diese Versuche ließ sich weiterhin die vaccinale Gewebeimmunität deutlich von der Gewebeallergie abtrennen. Art und Zustandekommen der Versuche, die Möglichkeit ihrer praktischen Auswertung für die Wertbemessung von Impfstoffen, wurden diskutiert. Auf die Bedeutung der Versuche für die Immunitätslehre hinsichtlich der Stellung und der Zusammengehörigkeit von Gewebeimmunität und Gewebeallergie wird hingewiesen.

Literaturverzeichnis

1. AISENBERG, A.C.: Immunologic status of Hodgkin's disease. *Cancer* 19/3, 385-394 (1966)
2. ARNASON, B.G., and B.H. WAKSMAN: Tuberculin-sensitivity. Immunologic considerations. *Adv. Tuberc. Res.* 13, 2-97 (1964)
3. BARANDUN, S., H. COTTIER, A. HÄSSIG und G. RIVA: Das Antikörpermangelsyndrom. In: W.D. GERMER: Anaphylaxie und Allergie. Basel und Stuttgart: B. Schwabe u. Co. 1959
4. BAUM, P., und K.H. MEYER zum BÜSCHENFELDE: *Vaccinia gangraenosa et generalisata bei Lymphogranulomatose.* *Med. Welt* 17 (N.F.), 878-881 (1966)
5. BIRKHAUG, K.: Concurrent development and subsequent dissociation of anaphylaxis, allergy and immunity in tuberculosis. *Acta med. scand.* 112, 393 (1942)
6. BOYDEN, S.V., and E. SORKIN: The adsorption of antigens by spleen cells previously treated with antiserum in vitro. *Immunology* 3, 272 (1960)
7. CHASE, M.W.: The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 59, 134 (1945)
8. DIMROTH, K., und L. JAENICKE: Verschiedenartig zusammengesetzte Pentose-Nucleinsäuren der Hefe. (2. Mitteilung über Nucleinsäuren). *Zschr. f. Naturforschung* 5_b, 185 (1950)
9. ELBERG, S.S.: Cellular immunity. *Bact. Rev.* 24, 67 (1960)
10. FAVOUR, C.B.: Lytic effect of bacterial products on lymphocytes of tuberculous animals. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 65, 269 (1947)

11. GOOD, R.A., W.D. KELLY, J. RÖTSTEIN and R.L. VARCO:
Immunological deficiency diseases. Agammaglobulinaemia,
hypogammaglobulinaemia, Hodgkin's Disease and Sarcoidosis.
Progr. Allergy 6, 187-319 (1962)
12. GÜNTHER, O.: Die "Gewebeimmunität" im Stufenschema der
Immunität. Zbl. Bakt. 1. Orig. 198, 181-184 (1965)
13. GÜNTHER, O.: Die Entwicklung der Immunität. Dtsch. med.
Wschr. 89, 2449 (1964)
14. HANSEN, K.: Allergie. Georg Thieme, Stuttgart 1957
15. HOLLAND, J.J., and M.J. PICKETT: A cellular basis of
immunity in experimental brucella infection. J. exp. Med.
108, 343 (1958)
16. HORSTER, J.A.: Agammaglobulinämie. Dtsch. med. Wschr.
84, 42 (1959)
17. KEMPE, C.H.: Studies on smallpox and complications of
smallpox vaccination. E. Mead Johnson award adress.
Pediatrics 26, 176 (1960)
18. LAWRENCE, H.S.: Some biological and immunological
properties of transfer factor. In: Cellular Aspects of
Immunity. London: Churchill 1960
19. LENNOX, B., W.J. DEMPSTER and J.W. BOAG: Suppression
of the tuberculin reaction in rabbits by total body
irradiation with x-rays. Brit. J. exp. Path. 33, 380 (1952)
20. LETTERER, E.: Allgemeine Pathologie. Grundlagen und
Probleme. Stuttgart: Georg Thieme 1959
21. - - : Die Bedeutung von Immunvorgängen für die
Entstehung und Gestaltung von Krankheiten. Der Internist
4. Jahrgang, 7. Heft, Seite 241-248 (1963)
22. LURIE, M.B.: Studies on the mechanism of immunity in
tuberculosis. The fate of tubercle bacilli ingested

- by mononuclear phagocytes derived from normal and immunized cells. J. exp. Med. 74, 247 (1942)
23. MAYR, A.: Über Resistenz und Immunität. In: A. HERRLICH: Handbuch der Schutzimpfungen. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1965
24. MIESCHER, P.A.: Autosensibilisierung. Dtsch. med. Wschr. 85, 706 (1960)
25. NASEMANN, T.: Die Infektion durch das Herpes simplex-Virus. Gustav Fischer, Jena 1965
26. POMALES-LEBRON, A., and W.R. STINEBRING: Intracellular multiplications of brucella abortus in normal and immune mononuclear phagocytes. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 94, 78 (1957)
27. RHODES, A.J., and C.E. van ROYEN: Herpes simplex. In: Textbook of Virology, 136-143, fourth edition. Baltimore: The Williams and Wilkins Comp. 1962
28. SCHMID, F.: Die Tuberkulincytolyse. Beitr. Klin. Tuberk. 109, 151 (1953)
29. - - : "Immunbiologie" (der Tuberkulose). In: Handbuch der Kinderheilkunde, Band V, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963
30. SCHULTZE, H.E.: Bildung der Antikörper. 10. Colloquium der Gesellschaft für physiologische Chemie am 9./18. April 1959 in Mosbach/Baden. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960
31. SORKIN, E.: Die pathogene Bedeutung immunologischer Reaktionen. Schweiz. med. Wschr. 96/35, 1129-1133 (1966)
32. SPIESS, H.: "Beeinflußt ein Blutaustausch beim Neugeborenen die Reaktion auf spätere Schutzimpfungen?" Dtsch. med. Wschr. 89, 579 (1964)

33. STICKL, H.: Die Übertragung der vaccinalen Gewebeeimmunität auf Gewebekulturen. Z. Hyg. 151, 149-159 (1965)
34. - - : 1966, unveröffentlicht
35. - -, und A. AUFGKOLK: Neuraminsäurehaltige Körpersubstanzen in ihrer Wirkung auf das Bakterienwachstum. Klin. Wschr. 39, 111 (1961)
36. - -, und J. ENGELHARDT: Die Gewebeeimmunität nach der Pockenschutzimpfung und ihr Nachweis mit Hilfe der Immuncytolyse: Ausarbeitung eines Mikrotestes für die Praxis. Münch. med. Wschr. 106/50, 2302 (1964)
37. - -, und J. ENGELHARDT: Die Leukocytolyse als Zeichen der spezifischen Reaktionsfähigkeit der Gewebe auf Vaccine-Virus nach der Pockenschutzimpfung. Klinische, experimentelle und elektronenmikroskopische Untersuchungen. Z. Hyg. Infekt. 151, 111-148 (1965)
38. - -, O. GOETZ und H. TRAUZETTEL: Klinische und experimentelle Untersuchungen zur passiven Übertragbarkeit der vaccinalen Gewebeallergie. "Cellulärer Transfer" der Reaktionsfähigkeit vom verzögerten Typ. Z. med. Mikrobiol. u. Immunol. 152, 176-187 (1966)
39. STRÖM, L.: A study of the cutaneous absorption of BCG. Vaccine labelled with radioactive phosphate in subjects with or without immunity. Acta tuberc. scand. 31, 141 (1953)
40. SZABÓ-SOMOGYI, J.: Wechselwirkung von Leukozyten und Serumproteinen im Hinblick auf die Infektabwehr. Helvetica Paediatrica Acta, Vol 17, Fasc. 3, 207-217 (1962)
41. TRAUZETTEL, H.: Dissertation, München 1965
42. UHR, J.W., and M. SCHARFF: Effect of x-irradiation upon delayed hypersensitivity and antibody formation in guinea-pigs. J. clin. Invest. 38, 1049 (1959)

43. WALLGREN, A.: Immunity in tuberculosis. Acta tuberc.
scand. 28, 155 (1953)

Herrn Prof. Dr. H.Stickl danke ich für die Überlassung
des Themas, des Arbeitsplatzes sowie die hilfsbereite
Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf:

Am 22. Mai 1940 wurde ich als Sohn des jetzigen Direktors der Staatlichen Münzsammlung München, Dr. Paul Grotemeyer, und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Scherer, in Wien geboren. Die Volksschule besuchte ich von 1946 bis 1950 in Frasdorf/Chiemgau, anschließend trat ich in das Wittelsbacher Gymnasium (Zweig: Realgymnasium) in München ein. Ich schloß es 1959 mit der Reifeprüfung ab. Nach Ableistung des Wehrdienstes begann ich 1961 mit dem Studium der Medizin an der Universität München. Hier legte ich 1962 die naturwissenschaftliche und 1964 die ärztliche Vorprüfung ab. Mein Studium beendete ich 1967 mit der ärztlichen Prüfung.

